

Jihočeská Univerzita  
Přírodovědecká fakulta



*Poruchy integrity chromatinu spermií  
u mužů z párů s idiopatickou sterilitou*

Rigorózní práce

**Mgr. Petra Marková**

České Budějovice

2012

**Marková, P., 2012.** „*Poruchy integrity chromatinu spermií u mužů z párů s idiopatickou sterilitou*“ (“*Disorders of sperm chromatin integrity in men from idiopathic infertility couples*”, RNDr. Thesis, in Czech). Rigorózní práce v českém jazyce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích.

#### **Annotation:**

Damage to chromatin, the genetic component of spermatozoa seems to play an important role in human infertility. This factor is rather underestimated, though methods for evaluation of sperm chromatin integrity are available. In this study, we compared semen quality in men assigned to two defined groups: men from couples with unexplained infertility (idiopathic infertility) and young men with no experience of infertility. There were smokers and nonsmokers in both groups. All semen samples were examined by standard ejaculation analysis and by using Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) for measurement of DNA damage. This is the only method that gives thresholds for determination of infertility in relation to chromatin integrity. Sperm chromatin damage was significantly higher in men from the first group than in the second group. The same result was obtained by comparison of normozoospermic samples from both groups. We did not confirmed a clear relation between smokers and their examined semen parameters from both groups. There is also no evidence for relation between standard sperm parameters and degree of DNA breaks. According to these results, we assume that chromatin disorders can be the causal factor of infertility. SCSA is a convenient method that facilitates the identification of infertile men with normal sperm parameters. Unfortunately this method is very expensive and inaccessible for medical practice. In the future, it is necessary to chart and find the context between infertility and genetic abnormalities of sperm. Then it will be possible to make some preventive precautions which would eliminate negative consequences of sperm abnormalities on the conception and enhance the probability of healthy newborn births.

#### **Finanční podpora:**

Tato práce byla finančně podpořena grantem č.1QS500390506 a interními prostředky Sanatoria ART s.r.o. v Českých Budějovicích.

#### **Poděkování:**

Chtěla bych tímto poděkovat Romanu Rybářovi za důkladné obeznámení s problematikou lidských spermií a jejich genomem, za praktickou pomoc při zvládnání metodik, za porozumění výsledkům a jejich interpretaci a za sepsání této publikace. Dále děkuji Jiřímu Rubešovi, svému školiteli, za vstřícné a přátelské uvítání na půdě Výzkumného ústavu veterinárního lékařství a za umožnění využívání znalostí a zkušeností zaměstnanců tohoto pracoviště, Františku Marcovi za cenné rady, ochotu a neutuchající optimismus a v neposlední řadě také Radomíru Thalerovi, řediteli Sanatoria ART s.r.o., za finanční a materiální podporu.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že svoji rigorózní práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své rigorózní práce, a to ve zkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

.....  
Mgr. Petra Marková

V Českých Budějovicích, 22.2.2012.

Věc: **Prohlášení o spoluautorském podílu**

Tímto prohlašuji, že Mgr. Petra Marková významným podílem přispěla k publikaci výsledků formou původní práce v časopisu *Andrologia* ( *Rybar R, Markova P, Veznik Z, Faldikova L, Kunetkova M, Zajicova A, Kopecka V, Rubes J Sperm chromatin integrity in young men with no experiences of infertility and men from idiopathic infertility couples. Andrologia. 2009;41(3):141-9.*

Podíl na publikované práci spočíval v definování, vytvoření a vyšetření skupiny mužů z párů s idiopatickou infertilitou. Významným způsobem přispěla k vytvoření práce samotné formou konzultace a interpretace získaných výsledků.



RNDr. Roman Rybář, Ph.D.

(první autor publikované práce)

V Brně, dne 15.2.2012

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	1
1.1. <i>Definice idiopatické sterility</i>	1
1.2. <i>Hodnocení kvality semene</i>	1
1.3. <i>Struktura chromatinu lidských spermií</i>	2
1.4. <i>Mechanismy vzniku chromatinových zlomů</i>	4
1.4.1. <i>Oxidativní stres</i>	5
1.4.2. <i>Poškození DNA spermií a životní styl</i>	6
<b>2. METODY</b>	7
2.1. <i>Metody hodnotící integritu chromatinu spermií</i>	7
2.2. <i>Sperm chromatin structure assay (SCSA)</i>	8
<b>3. ORIGINÁLNÍ PUBLIKACE</b>	10
3.1. <i>Komentář k originální publikaci</i>	10
3.2. <i>Abstrakt publikace pro zkrácenou verzi rigorózní práce</i>	11
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	12
4.1. <i>Poruchy integrity chromatinu spermií a jejich podíl na idiopat. sterilitě páru</i>	12
4.2. <i>Osud infertilních párů ze studie</i>	13
<b>5. LITERATURA</b>	15

# 1. ÚVOD

## 1.1. Definice idiopatické sterility

V současné době poruchou plodnosti trpí asi 15% párů. Ve 30-50% případů je příčina na straně muže (Maduro a Lamb, 2002), přibližně stejný podíl tvoří příčiny na straně ženy a nejméně u poloviny případů shledáváme příčinu jak na straně muže, tak na straně ženy (Seshagiri, 2001). Idiopatická sterilita (sterilita, jejíž příčinu není možno současnými vyšetřovacími technikami a postupy vysvětlit) se vyskytuje přibližně u 10% z těchto párů, ale toto číslo je značně variabilní v závislosti na zvoleném vyšetřovacím algoritmu. I samotná definice idiopatické sterility je velice široká a může se do značné míry překrývat s jinými definovanými skupinami, protože řada dějů souvisejících se vznikem těhotenství je v dnešní době dosud nejasná.

V běžné praxi se tedy za idiopatickou sterilitu páru pokládá taková, kde parametry charakterizující kvalitu semene muže jsou v mezích normy určených WHO (*“WHO laboratory manual for the examination of human semen and cervical mucus interaction, fourth edition. Cambridge University Press, Cambridge, 1999”*), u ženy se nenalezne žádný anatomický ani fyziologický defekt v jejím reprodukčním systému a hormonální profil, imunologický screening a genetická vyšetření obou partnerů jsou v normě.

## 1.2. Hodnocení kvality semene

Kvalita semene muže je rutinně hodnocena celkovou koncentrací spermií v 1 ml ejakulátu (min. 20 mil/ml), dále procentem pohyblivých spermií (50% a více motilních spermií) a kvalitou jejich pohybu (progresivní x neprogresivní), morfologií spermií (15% a více morfologicky normálních spermií) a koncentrací přídatných buněčných elementů (spermatidy, spermatocyty, leukocyty, erytrocyty, bakterie, epitelie, atd.). Pro zhodnocení správné funkce gonád je měřen objem ejakulátu (2-6 ml), jeho pH (7,2-7,8), viskozita a je hodnocena míra a rychlost kolikvace (zkapalnění) ejakulátu. Dále může být hodnocena například vitalita spermií či biochemické složení semenné plazmy. Vedle klasických přístupů hodnocení ejakulátu existuje řada barvicích technik a funkčních testů hodnotících kvalitu semene z různých dalších hledisek, které jsou využívány hlavně ve veterinárním lékařství a pro plemenitbu hospodářských zvířat, ale v humánní medicíně jsou spíše

výzkumnou a pro praxi zatím okrajovou záležitostí. Jednou z příčin tohoto stavu je rychlý rozvoj mikromanipulačních technik (ICSI – *intracytoplasmatic sperm injection into oocyte*), umožňujících fertilizaci oocytů s minimálním počtem spermií získaných z ejakulátu nebo přímo chirurgicky z epitelu varlat či z nadvarlete a následné vyloučení neperspektivních embryí během vývoje pomocí preimplantační genetické diagnostiky (PGD - *preimplantation genetics diagnosis*) v procesu *in vitro* fertilizace (IVF).

Pouhý spermioqram bohužel není stále schopen odhalit asi 30% případů mužské neplodnosti (Evenson a kol., 2002). Příčin neplodnosti u muže je mnoho. Jednou z nich je i genetická abnormalita spermií, která se může podílet na idiopatické sterilitě páru (Seshagiri, 2001). Hodnocení kvality genetického materiálu spermií není v klinické praxi zatím příliš běžné.

Pokud se k němu přistoupí, mohou být hodnoceny strukturální abnormality a počty jednotlivých chromosomů v jádrech spermií, kdy jejich nadbytek nebo nedostatek vede ke vzniku aneuploidních neperspektivních embryí. Tyto abnormální spermie mohou vznikat během spermatogeneze jako důsledek nestandardního počtu či netypické chromosomální struktury v karyotypu jejich nositele nebo se mohou vytvářet *de novo*.

Na druhé straně může být pohlíženo na genetickou kvalitu spermií hodnocením integrity jejich chromatinu, která musí být zachována pro správnou funkci spermií po oplození. Odchytky od normálu v obou případech mají jednoznačný dopad na fertilizační schopnost jedince.

### **1.3. Struktura chromatinu lidských spermií**

Během spermatogeneze haploidní chromatin spermií prochází zásadními změnami. Nejprve jsou téměř všechny histony nahrazeny tranzitními proteiny a potom protaminy (Meistrich a kol., 2003). Protaminy jsou malé (50-57 aminokyselin v řetězci), vysoce bazické proteiny bohaté na arginin (40-47%) a cystein (8-18%). Díky protaminům se DNA spermií stává vysoce kondenzovanou a odolnou vůči mechanickému poškození (Tateno a kol., 2000). Maximální kondenzace chromatinu má své opodstatnění a umožňuje přenos paternálního genomu do oocytu v původním nepoškozeném stavu. Následné změny v této struktuře vedou k iniciaci a regulaci paternální genové aktivity v časných stádiích

embryonálního vývoje (Haaf a Ward, 1995). Správná kondenzace chromatinu je tedy podmínkou fertilizační schopnosti spermie (De Jonge, 2002).

Vazba protaminů na DNA je velmi pevná a stáčí DNA do prstencových útvarů, kde každý prstenec obsahuje přibližně 50 kb DNA (Tateno a kol., 2000). Paradoxně DNA ve vazbě s protaminy je následně daleko méně spiralizována než DNA s histony v somatických buňkách (Ward a kol., 1989; Ward, 1993). Je důležité poznamenat, že ne všechny histony jsou ve zralé spermii nahrazeny protaminy. Přibližně 15% histonů zůstává zachováno (Aoki a Carrell, 2003). Někteří autoři uvádí, že lidské spermie mají histony přítomny především na telomerách (Gineitis a kol., 2000; Zalensky a kol., 2002). Jiní autoři se domnívají, že histony jsou lokalizovány v místech, kde se DNA dotýká MARs (*matrix attachment regions*) (Pittoggi a kol., 2000; Wykes a Krawetz, 2003b). Není tedy zcela jasné, které části chromatinu mají zachovány histony, ale je jednoznačné, že výměna proteinů není komplexní. Patologické narušení procesu výměny histonů za protaminy během spermatogeneze vede k nedokonalé reparaci zlomů v DNA a tím k poškození integrity chromatinu (Manicardi a kol., 1995). Rovněž snížený obsah protaminů vede ke snížení ochrany genetického materiálu spermie a v důsledku snížené hustoty kondenzace DNA k nestabilitě a citlivosti k denaturačnímu stresu (de Yebra a kol., 1993).

Chromatin spermii je pravděpodobně organizován do smyček, které jsou uchyceny na nukleární matrix podobně jako v somatických buňkách (Sotolongo a Ward, 2000; Ward a kol., 2000; Schmidt a kol., 2001). Každý protaminový prstenec je spojen touto smyčkou (*linker*) s dalším protaminovým prstencem (Sotolongo a kol., 2003). Tyto smyčky obsahují přibližně 50 kb stejně jako protaminový prstenec. Tato spojovací místa, která jsou „odkryta“, jsou pravděpodobně hlavním kandidátem pro možné poškození DNA (Ward a kol., 1989).

Výše popisovaný model chromatinové struktury spermii vytváří tedy tři možná místa, kde může být DNA poškozena. Prvním a nejpravděpodobnějším místem jsou zmiňované spojovací oblasti mezi protaminovými prstenci. Struktura těchto oblastí není dobře známá, podle některých autorů obsahuje protaminy (Sotolongo a kol., 2003), podle jiných histony (Wykes a Krawetz, 2003a; Martins a kol., 2004). Tyto úseky chromatinu zřejmě obsahují aktivní místa, která jsou spojena s nukleární matrix (Spadafora, 1998). Pokud by tato aktivní místa byla obdobná jako u chromatinu somatických buněk, potom by byla funkční oblastí DNA spermii (Pienta a kol., 1991). Jestliže by platila tato hypotéza, detekce zlomů DNA v těchto oblastech by byla dostatečným markerem vyjadřujícím vztah k infertilitě.

Druhou možnou oblastí jsou chromatinová vlákna nacházející se na povrchu protaminových prstenců. Přítomné protaminy zřejmě mohou silně inhibovat aktivitu DNA



polymerázy, takže poškození v těchto místech jsou velmi těžko detekovatelná. Třetím místem jsou chromatinová vlákna nacházející se uvnitř protaminových prstenců. Ta jsou zcela obklopena sousedními protaminovými vlákny a nejsou přístupná žádným enzymům, pokud je prsteneček kompaktní.

#### **1.4. Mechanismy vzniku chromatinových zlomů**

Porozumění mechanismům, kterými vznikají chromatinové zlomy, má klinický význam pro humánní medicínu právě proto, že jejich přítomnost často koreluje s mužskou infertilitou. V současné době byla publikována celá řada prací zabývajících se hypotézami původu těchto zlomů. Možnosti vzniku zahrnují jednak abortivní apoptózu spermií (Sakkas a kol., 2003), nekompletní opravu zlomů indukovaných topoizomerázou II při výměně histonů za protaminy (Sakkas a kol., 1999; Marcon a Boissonneault, 2004), přítomnost dalších endogenních nukleáz, které mohou být aktivovány za různých podmínek a které jsou normálně nezbytné v procesu spermatogeneze (Maione a kol., 1997; Sotolongo a Ward, 2000; Sotolongo a kol., 2003, 2005) a tvorbu volných reaktivních kyslíkových radikálů (ROS – *reactive oxygen species*), které mohou způsobovat DNA zlomy zralých spermií (Aitken a kol., 2003; Muratori a kol., 2003).

ROS zahrnují řadu metabolitů, které vznikají zejména redukcí kyslíku. Patří sem především superoxidový aniont ( $O_2^-$ ), radikály typu peroxy ( $ROO^\cdot$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a hydroxylové radikály ( $OH^\cdot$ ), i když se pod touto zkratkou rozumí celá řada dalších reaktivních molekul. I volné radikály odvozené od dusíku hrají významnou roli v reprodukci a fertilizaci. Tvorba ROS nehraje roli pouze v patologických procesech, ale je důležitou součástí biochemických cest majících centrální úlohu v regulaci buněčných funkcí.

Tyto volné radikály obsahují atom nebo molekulu s nespárovanými elektrony, které jsou vysoce energeticky nabitě a hledají jiné volné elektrony vhodné ke spárování. Proto jsou velmi reaktivní a mají schopnost modifikovat strukturu mnoha různých molekul zahrnujících proteiny, lipidy i nukleové kyseliny, čímž poškozují jejich přirozenou funkci. Například peroxidace lipidů plazmatické membrány může vést ke ztrátě motility spermií, protože dochází ke změně její struktury a pružnosti, která se projeví poruchou funkce bičíku. Dále poškození integrity membrány může vést k poruše funkcí závislých na membránové aktivitě jako je fúze spermie-oocyt či akrozomální reakce (Jones a kol., 1978; Aitken a kol., 1993a,b).

### 1.4.1. Oxidativní stres

Oxidativní stres je i hlavní příčinou poškození DNA lidských spermií. Řada studií ukazuje, že s nedostatečnou kondenzací chromatinu jádra roste vnímavost spermií k oxidativnímu poškození, a že spermie s již narušenou DNA jsou citlivější k možnosti dalšího poškození působením H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a radičního záření (McKelvey-Martin a kol., 1997; Hughes a kol., 1998). Původ ROS, a tedy i oxidativního poškození, může být různý. V první řadě jsou ROS produkovány leukocyty, které kontaminují v určitém množství každý vzorek semene. Z nich nejzásadnější efekt mají neutrofilové a makrofágy, které v aktivním stavu produkují volné radikály a poškozují spermie v závislosti na jejich koncentraci (Aitken a kol., 1995). Záleží tedy na typech leukocytů, na stavu jejich aktivace a původu (Aitken a Baker, 1995). Pokud leukocyty pochází ze sekundárních pohlavních orgánů jako je prostata nebo seminální vajíčka, jejich schopnost způsobit oxidativní poškození, je zanedbatelná. Volné radikály jsou neutralizovány přirozenými antioxidanty přítomnými v seminální plazmě (Aitken a Baker, 1995; Sikka a kol., 1995, Aitken a kol., 1996). Jestliže leukocyty mají původ ve vas deferens, v testes nebo v epididymis, potom ROS jimi produkováné mají dostatečné množství příležitostí k poškození spermií a jejich DNA. Bohužel není možné detekovat jednoznačně původ seminálních leukocytů, takže jejich patologický vliv na spermie v jednotlivých případech je těžko hodnotitelný.

Pokud množství leukocytů v ejakulátu přesáhne hodnotu 1 mil/ml, je nález označován jako leukocytospermie. Relativně hodně mužů vykazuje leukocytospermii bez jiných příznaků (Wolf, 1995). Muži se symptomatickými genitálními infekcemi mají obvykle leukocytospermii. Naopak leukocytospermie není spolehlivý ukazatel asymptomatické urogenitální infekce (Barratt a kol., 1990). Leukocytospermie byla pozorována v asociaci se zvýšenou koncentrací nezralých buněk v ejakulátu. Aktivace leukocytů má zřejmě klíčovou roli ve vztahu k zánětu a neplodnosti. Cytokiny produkováné leukocyty poškozují funkci Sertoliho buněk, což může narušit proces spermatogeneze a tím zvýšit podíl nezralých forem v ejakulátu.

Dalším potenciálním zdrojem ROS jsou samotné spermie (Aitken a West, 1990; Aitken a kol., 1992; Iwasaki a Gagnon, 1992). Jejich produkce je důsledkem defektních funkcí spermií. Je potvrzena jednoznačná korelace mezi množstvím ROS (detekovaných pomocí chemiluminiscence), peroxidací lipidů plazmatické membrány a DNA poškozením spermií (Aitken a kol., 1993b; Gomez a kol., 1998). Oxidativní stres může mít také původ už

v zárodečné linii jako důsledek nedostatečné aktivity přirozených antioxidantů v mužském reprodukčním traktu (Sharma a Agarwal, 1996).

#### **1.4.2. Poškození DNA spermií a životní styl**

Poškození DNA spermií může mít i jiný původ. Může být důsledkem řady faktorů jako je věk (Singh a kol., 2003), povolání (Olshan a Mattison, 1994; Knight a Marrett, 1997), kouření (Ji a kol., 1997) nebo přítomnost některých typů nádorů (Kobayashi a kol., 2001). Tyto faktory pak mohou mít negativní vliv na zdraví potenciálních potomků díky přenosu poškozené DNA spermií do zygoty během fertilizace. V současné době existuje řada důkazů vyjadřujících zřejmou souvislost mezi nárůstem incidence onemocnění jako jsou rakovina, schizofrenie nebo dominantní genetické mutace u dětí mužů se zvýšeným podílem poškozené DNA spermií v souvislosti s věkem, životním stylem či zaměstnáním (Lewis a Aitken, 2005). Frekvence spontánních mutací v mužských zárodečných buňkách je extrémně nízká, proto vznik patologie je spíše důsledkem aberantního opravného mechanismu poškozené DNA než důsledkem přímého přenosu mutace ze zárodečné buňky na potomka (Aitken, 1999; Aitken a Marshall Graves, 2002; Aitken a kol., 2004).

## 2. METODY

### 2.1. Metody hodnotící integrity chromatinu spermií

Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících strukturu chromatinu spermií s cílem určit, zda je možno najít souvislost mezi některými případy idiopatické sterility a poškozením chromatinu spermií. Poškození DNA spermií se nemusí nutně promítnout přímo do jejich morfologie a motility, ale spíše redukuje schopnost spermií fertilizovat oocyty a může inhibovat následný embryonální vývoj (Haaf a Ward, 1995). Abnormality v samčím genomu mohou vést buď k odumření zygoty záhy po oplození (Sakkas a kol., 1999) anebo k časným abortům (Evenson a kol., 2002).

V poslední době byla publikována řada prací popisujících a hodnotících tyto techniky a jejich vztah k fertilitě (De Jonge, 2002; Evenson a kol., 2002; Agarwal a Said, 2003; Sakkas a kol., 2003; Spano a kol., 2005). Mezi tyto techniky patří například TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick and labeling assay*), *In situ* translation assay, COMET assay nebo SCSA (*sperm chromatin structure assay*). Poslední zmiňovaná metoda byla použita jako stěžejní pro hodnocení integrity chromatinu spermií v přiložené práci a je popsána níže. Jednotlivé metody se liší zejména tím, zda jsou schopny detekovat jednořetězcové (ss) nebo dvouřetězcové (ds) zlomy DNA, a dále ve kterých místech složité chromatinové struktury jsou schopny tyto zlomy označit (tedy zda jsou schopny odstranit histony a protaminy z vazby na DNA, které znemožňují přístup k poškozenému chromatinu).

Metoda TUNEL je založena na navázání deoxyuridin trifosfátu (dUTP) prostřednictvím na templátu nezávislém enzymu terminal deoxynukleotidyl transferázy (TdT) na volné 3'OH konce DNA řetězce a vytvářející na tomto konci poly-U prodloužené úseky (Sgonc a Gruber, 1998). Tyto inkorporované nukleotidy jsou značeny biotinem a následně detekovány fluorescenčními protilátkami. TUNEL detekuje jak ss tak ds zlomy, ale nedokáže odstranit z vazby na DNA ani histony ani protaminy (Sakkas a kol., 2002; Marcon a Boissonneault, 2004).

Metoda *In situ* nick translation pracuje na podobném principu jako TUNEL. Zde jsou inkorporovány biotinem značené dUTP na ssDNA zlomy pomocí na templátu závislém enzymu DNA polymerázy I. Podobně jako TUNEL nedokáže odstranit z vazby na DNA

protaminy ani histony. Obě metody tedy detekují zejména zlomy ve spojovacích místech mezi protaminovými prstenci.

COMET assay (Ostling a Johanson, 1984) využívá elektroforézy pro analýzu DNA zlomů jednotlivých spermií. Tato elektroforéza probíhá na sklíčku v tenké vrstvě agarózy. Během této metody jsou odstraňovány všechny protaminy a histony z vazby na DNA, čímž je umožněna detekce zlomů i z jinak kompaktních DNA prstenců. Pokud probíhá tento proces v alkalických podmínkách, je možno detekovat ss i ds zlomy DNA. Volné fragmenty DNA migrují k pozitivní elektrodě a vytváří obrazec podobný ocasu komety. Výsledkem této metody je detekce celé řady zlomů, ale bez možnosti určení jejich chromosomální lokalizace. Někteří pacienti s poruchou struktury nukleární matrix spermií mohou být charakterizováni velkým podílem DNA zlomů detekovaných právě touto metodou (Barone a kol., 2000).

## **2.2. Sperm chromatin structure assay (SCSA)**

Analýza integrity chromatinu spermií pomocí průtokové cytometrie byla poprvé popsána v roce 1980 (Evenson a kol., 1980). Později byla dalšími autory testována a analyzována (Ballachery a kol., 1987; Ahlering a kol., 2003; Larson-Cook a kol., 2003). Tato metoda využívá kyselý (pH=1,2) nebo tepelné částečné denaturace DNA spermií, které obsahují ss i ds DNA zlomy. K denuraci nedochází v místech chromatinových prstenců, protože během této metody neprobíhá enzymatické odstranění protaminů z vazby na DNA a v místech DNA, které neobsahují zlomy, protože ty jsou intaktní k denaturačním podmínkám. Následně jsou jádra spermií označena akridin oranží, u níž dochází po navázání k metachromatickému posunu, ssDNA zlomy jsou obarveny červeně, dsDNA zlomy zeleně po ozáření monochromatickým laserovým modrým světlem o vlnové délce 488 nm. Kondenzovaný chromatin neváže dobře akridin oranž (Evenson a Jost, 2000), a proto jsou spermie, jejichž DNA zůstává po denuraci kondenzována, separovány průtokovým cytometrem. Poměr červeně zbarvených spermií k celkovému počtu zbarvených spermií (zelené + červené spermie) se označuje jako DFI (*DNA fragmentation index*) a vyjadřuje stupeň poškození DNA. Po analýze ejakulátu se na výsledném cytogramu objeví několik populací buněk. Vedle hlavní populace spermií s nedetekovaným DFI (populace buněk s nepoškozeným chromatinem), je přítomna populace spermií s porušenou integritou chromatinu s detekovaným DFI o určité velikosti, dále populace nezralých forem spermií

(zejména spermatid), které vykazují 5x nižší stupeň kondenzace chromatinu než zralé formy, a proto jsou vysoce barvitelné a označují se jako HDS populace (*high DNA stainability cells*). V případě infekce urogenitálního traktu muže je metoda schopna detekovat i specifickou populaci bakterií či leukocytů.

V klinické praxi má hodnota DFI vypovídající hodnotu pro stanovení úrovně infertility *in vivo*. Rozsáhlé studie, které se zabývaly integritou chromatinu ve spermiích, daly postupně základ pro stanovení hranic DFI, které umožňují kategorizovat stupeň poškození chromatinu ve spermiích. DFI 0-15% odpovídá vysokému, 16-29% střednímu a více než 30% velmi nízkému fertilizačnímu potenciálu (Evenson a kol., 2002). U mužů majících obsah HDS nad 15% dochází k významně nižší fertilizační schopnosti při IVF (Ahlering a kol., 2003). SCSA je v současné době nejlepší metodou pro predikci úspěšnosti asistované reprodukce zahrnující zejména fertilizaci oocytů a implantaci embryí (Larson a kol., 2000; Januskauska a kol., 2001).

### 3. ORIGINÁLNÍ PUBLIKACE

#### 3.1. Komentář k originální publikaci

Rybar R., **Markova P.**, Veznik Z., Faldikova L., Kunetkova M., Zajicova A., Kopecka V., Rubes J. (2009) Sperm chromatin integrity in young men with no experiences of infertility and men from idiopathic infertility couples. *Andrologia* **41** (3):141–149.

Uvedená publikace vznikla ve spolupráci Výzkumného ústavu veterinárního lékařství (VÚVL) v Brně s centrem asistované reprodukce Sanatoriem ART s.r.o. v Českých Budějovicích. Ústav veterinárního lékařství poskytl do této studie kontrolní skupinu - vzorky semene mladých mužů, univerzitních studentů, kteří doposud neměli prokázanou fertilizační zkušenost. Sanatorium ART nashromáždilo během dvou let sperma mužů z infertilních párů, kde čas a ani opakovaná vyšetření neprokázala žádnou zřejmou příčinu jejich snížené fertility (standardní vyšetřovací algoritmus).

K hodnocení integrity chromatinu spermií pro tuto publikaci byla použita již výše zmíněná metoda *Sperm chromatin structure assay* (SCSA). Provedení všech vyšetření za použití průtokového cytometru, jako základního přístroje pro tuto metodiku, bylo umožněno Výzkumným ústavem veterinárního lékařství, v jehož majetku se přístroj nachází. Konečné statistické hodnocení jednotlivých měření bylo stanoveno za pomoci softwaru vytvořeného pro hodnocení výsledků získaných z SCSA (viz. publikace) zakoupeno taktéž Výzkumným ústavem veterinárního lékařství.

Vedle této metody byly dále všechny vzorky spermatu mužů infertilních párů barveny různými barvicími technikami a míra poškození chromatinu spermií byla odečítána vizuálně pod mikroskopem na základě výsledků těchto barvení. Některé barvicí techniky byly prováděny na pracovišti Sanatoria ART v Českých Budějovicích v andrologické laboratoři, některé na Oddělení genetiky a reprodukce ve výše uvedeném ústavu v Brně. Všechny vzorky byly odečítány a hodnoceny pomocí mikroskopu Zeiss Axioplan II v Entomologickém ústavu BC AV ČR v Českých Budějovicích. Získané výsledky nejsou zahrnuty v této práci a měly by se stát základem pro studii o korelaci používaných metod v hodnocení integrity chromatinu spermií.

### **3.2. Abstrakt publikace pro zkrácenou verzi rigorózní práce**

Damage to the genetic component of spermatozoa seems to play the main role in a majority of cases where current approaches fail to reveal the specific cause of male infertility. In this study, we compared semen quality in men assigned to two defined groups; men from couples with unexplained infertility – idiopathic infertility (A) and young men with no experiences of infertility (B). All samples were examined by standard ejaculate analysis and sperm chromatin structure assay (SCSA). Sperm chromatin damage was significantly higher in men from group A than in those from group B. Similar results were obtained by comparison of men from group A (all men were normozoospermic) with normozoospermic men from group B. According to these results, we can suppose that chromatin disorders may be the causal factor of subfertility or infertility in some of these men. No evidence for a strong association between chromatin disorders and standard parameters of ejaculates was found. We failed to confirm a relationship between smoking and sperm quality in men from any of the investigated groups. SCSA is a method that facilitates the identification of infertile men who otherwise show normal semen variables.



## **4. VÝSLEDKY A DISKUZE**

### **4.1. Poruchy integrity chromatinu spermií a jejich podíl na idiopatické sterilitě páru**

Správná kondenzace a integrita chromatinu jádra spermií spolu s haploidním počtem všech chromosomů jsou nutným genetickým předpokladem pro úspěšnou koncepci a následný embryonální vývoj. Integrita chromatinu spermií, jako marker stanovení fertility, je mnohem více citlivějším parametrem než pouhé stanovení základních hodnot spermogramu (Rubes a kol., 2005). I u zdravých mužů s normálními hodnotami spermogramu mohou být základní podmínky integrity genomu porušeny a mohou být jednou z příčin neobjasněné sterility. Ač naše práce potvrdila, že jak koncentrace, tak motilita byla v případě mužů z infertilních párů celkově nižší než u kontrolní skupiny, pořád se hodnoty pohybovaly v mezích normy stanovené WHO.

Naše práce prokázala statisticky významný rozdíl mezi hodnotami DFI v případě mužů z infertilních párů (vyšší DFI) a kontrolní skupinou (nižší DFI), a to pokud šlo o srovnání jak normospermiků, tak i v případě abnormálních spermogramů, které byly také součástí kontrolní skupiny. Ve skupině infertilních párů byl statisticky významný větší podíl mužů s vyšším DFI (DFI > 30%) než u kontrolní skupiny. Hranice mezi středním (m-DFI) a vyšším (h-DFI) byla stanovena experimentálně (Evenson a kol., 2002) a my jsme ji v naší práci akceptovali. Toto rozdělení má zejména diagnostický a prognostický význam pro stanovení mužské fertility. DFI > 30% je považováno za velmi závažné poškození genetické informace spermií a je spojené jednoznačně s mužskou sterilitou (Evenson a kol., 2002).

Dalším sledovaným parametrem byla hodnota HDS, jehož hranice byla navržena na 15%, kdy rapidně klesá úspěšnost fertilizace *in-vitro* (Virro a kol., 2004). V tomto parametru jsme nezískali žádné statisticky významné rozdíly mezi sledovanými skupinami. Stejně tak hodnoty přesahující 15% v obou skupinách byly zastoupeny rovnoměrně. Dokonce v kontrolní skupině byl podíl mužů s hodnotami HDS >15% vyšší než ve sledované skupině infertilních mužů, tento rozdíl však nebyl statisticky významný.

Součástí naší studie bylo i srovnání sledovaných hodnot (standardní hodnoty ejakulátu, integrita chromatinu – DFI, HDS) mezi kuřáky a nekuřáky, kteří byli zastoupeni v obou skupinách ve stejném poměru. Naše práce nepotvrdila žádný statisticky významný rozdíl ani v jednom parametru. Podobné závěry byly již publikovány jinými autory (Oldereid a kol., 1989; Sergerie a kol., 2000). Je ale pravděpodobné, že bude záležet na intenzitě kouření (Chia a kol., 1994) a že kouření bude do určité míry ovlivňovat hodnoty

spermioqramu a míru integrity chromatinu (López Teijón a kol., 2007). Nicméně, vyšší míra poškození chromatinu byla pozorována stejně jak u kuřáků tak u nekuřáků z obou námi sledovaných skupin.

Dále jsme se zabývali vztahem mezi mírou poškození integrity chromatinu spermií a základními parametry ejakulátu jako je koncentrace, motilita a podíl patologických forem. Na toto téma byla publikována celá řada prací, které jsou však mnohdy značně kontroverzní a se zcela rozdílnými závěry. Naše výsledky ukázaly méně jednoznačný vztah mezi hodnotami DFI a motilitou spermií, než výsledky některých jiných autorů (Zini a kol., 2001a; Apedaile a kol., 2004; Payne a kol., 2005; Song a kol., 2006). Stejně tak nebyl prokázán vztah mezi procentem morfologicky abnormálních spermií a hodnotou DFI podobně jako u jiných autorů (Zini a kol., 2001a; Apedaile a kol., 2004; Song a kol., 2006). Na druhou stranu jsme potvrdili nízkou korelaci mezi DFI a koncentrací spermií, stejně jako další autoři (Richthoff a kol., 2002; Song a kol., 2006).

Na základě dosud publikovaných dat a našich výsledků, lze vyslovit hypotézu, že ve skupině párů s idiopatickou sterilitou bude s největší pravděpodobností určitý podíl zdravých mužů s normálními hodnotami spermioqramu, avšak se zvýšeným podílem spermií s poškozeným chromatinem, který může být příčinou jejich infertility, opakovaných spontánních abortů partnerky či opakovaně neúspěšných IVF cyklů. V případě párů s idiopatickou sterilitou, léčících se metodami asistované reprodukce, by se vždy mělo mimo jiné pomýšlet i na možnou souvislost s poškozením integrity genomu spermií. Neplodný pár by měl být v tomto směru informován a mělo by být zajištěno patřičné vyšetření pro stanovení výše rizika a predikce úspěšnosti *in vitro* fertilizace.

#### **4.2. Osud infertilních párů ze studie**

Jelikož jsem mapovala infertilní páry pro tuto studii poměrně dlouhou dobu, sledovala jsem jejich osud až do konce, kterým bylo buď narození zdravého dítěte, ukončení léčby pro opakované neúspěchy nebo opuštění našeho zdravotnického zařízení a tedy další osud páru byl neznámý. Zaznamenávala jsem si veškeré parametry a údaje, které jsem během léčby páru na našem pracovišti získala. Snažila jsem se najít další faktory, které by mohly ovlivnit případný úspěch či neúspěch páru a uvědomovala jsem si, že nikdy nemohu zachytit všechny faktory, jako například psychický stav jedince či celé rodiny. Následně jsem si zapisovala výsledky jednotlivých stimulačních cyklů a vše jsem se pokoušela

statisticky vyhodnotit. I když tyto výsledky nejsou náplní této rigorózní práce, považuji za zajímavé je zde alespoň okrajově zmínit.

Ze sledovaných infertilních párů 81,5% dosáhlo do konce roku 2010 úspěšné gravidity a porodilo dítě. Gravidity bylo u těchto párů dosaženo buď spontánní koncepcí, po intrauterinní inseminaci nebo po *in vitro* cyklu(ech). V této skupině bylo 1x porozeno dítě po intrauterinní inseminaci s nezachyceným Downovým syndromem. Přibližně 10,9% párů opustilo naše zařízení bez udání důvodu a 7,6% skončilo s léčbou pro opakované neúspěchy. Za zmínku stojí, že i muž s vysokým DFI (38,5%) a HDS (24,5%) byl nakonec úspěšný a partnerka po prvním stimulovaném *in vitro* cyklu porodila zdravé dítě. Na druhou stranu kouřící muž s DFI 31% odešel se svou partnerkou po 3 letech neúspěchu z našeho centra se žádostí o adopci. Ve skupině opakovaně neúspěšných párů se ale vyskytli i jedinci s DFI 14,9% a HDS 10,2% nebo DFI 12% a HDS 3,2%. Velice zajímavým výsledkem byla i spontánní gravidita ženy, jejíž partner měl DFI 68,4%.

Na základě těchto výsledků se lze domnívat, že stanovení kritických hodnot DFI a HDS je do značné míry pouze teoretické a prediktivní. Hlavní úlohu hraje s největší pravděpodobností čas a souhra všech parametrů nezbytný pro úspěšnou fertilizaci. Je tedy zřejmé, že muž s vysokým stupněm poškození DNA a normálním spermiogramem bude potřebovat delší čas a více příležitostí na zplodění zdravého potomka a že s určitou pravděpodobností se vlastního potomka nedočká. Pokud bude ale kvalitně zmapována souvislost mezi infertilitou páru a genetickým poškozením spermií, bude možno zvolit určitá preventivní a metodologická opatření, která by eliminovala důsledky negativního vlivu tohoto stavu na koncepci a zvýšila zmiňovanou pravděpodobnost početí zdravého potomka. Mezi tato preventivní opatření, která jsou již běžně doporučována infertilním párům, patří například eliminace nevhodného životního stylu, urogenitálních infekcí, kouření, expozice nebezpečným látkám či záření.

Dále je možno přistoupit například k preventivnímu podávání antioxidantů či využívat oplozovací metody ICSI (intracytoplazmatická injekce spermie do vajíčka) při zvýšených hodnotách HDS. V krajních případech je možno využít i sperma dárce, které je někdy jedinou možností k získání úplné rodiny.

## 5. LITERATURA

- Agarwal A and Said TM (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reprod Update* 9, 331-345.
- Ahlering P, Keskinetepe L, Sher G, Diech JD, Banner L, Maasaranti G (2003) The sperm DNA integrity assay (SDI) a valuable method for assessing sperm vitality in preparation for *in vitro* fertilization (IVF). *Fertil Steril* 80 (S3), 113.
- Aitken RJ (1999) The human spermatozoon – a cell in crisis? The Amoroso Lecture. *J Reprod Fertil* 115, 1-7.
- Aitken RJ and Baker HW (1995) Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Human Reprod* 10, 1736-1739.
- Aitken RJ and Marshall Graves JA (2002) The Y chromosome, oxidative stress and future of sex. *Nature* 415, 963.
- Aitken RJ and West K (1990) Relationship between reactive oxygen species generation and leucocyte infiltration in fractions isolated from the human ejaculate on Percoll gradients. *Int J Androl* 13, 433-451.
- Aitken RJ, Baker MA and Sawyer D (2003) Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 7, 65-70.
- Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K and Richardson DW (1992) Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients. *J Reprod Fertil* 94, 451-462.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW and Irvine DS (1995) Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Human Reprod* 10, 2061-2071.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A and Irvine DS (1996) Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress and sperm function. *Free Radic Biol Med* 21, 495-504.
- Aitken RJ, Harkiss D and Buckingham DW (1993a) Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 35, 302-315.
- Aitken RJ, Harkiss D and Buckingham DW (1993b) Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil* 98, 257-265.
- Aitken RJ, Koopman P and Lewis SE (2004) Seeds of concern. *Nature* 432, 48-52.
- Aoki VW and Carrell DT (2003) Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl* 5, 315-324.
- Apedaile AE, Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Johnston SA, Baker HW (2004) Flow cytometry and microscopic acridine orange test: relationship with standard semen analysis. *Reprod Biomed Online* 8, 398-407.
- Ballachery BE, Hohenboken WD and Evenson DP (1987) Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol Reprod* 36, 915-925.
- Barone JG, Christiano AP and Ward WS (2000) DNA organization in patients with a history of cryptorchidism. *Urology* 56, 1068-1070.
- Barratt CL, Robinson A, Spenser RC, Kinghorn GR, White A and Harrison PE (1990) Seminal peroxidase positive cells are not an adequate indicator of asymptomatic urethral genital infection. *Int J Androl* 13, 361-368.
- Chia SE, Xu B, Ong CN, Tsakok FM, Lee ST (1994) Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality. *Int J Fertil Menopausal Stud* 39, 292-298.
- De Jonge C (2002) The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. *Human Fertil (Camb)* 5, 51-53.

- de Yebra L, Balleca JL, Vanrell JA, Bassas L and Oliva R (1993) Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem* 268, 10553-10557.
- Evenson DP and Jost LK (2000) Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 22, 169-189.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131-1133.
- Evenson DP, Larson KL and Jost LK (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 23, 25-43.
- Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM and Zalensky AO (2000) Human sperm telomere-binding complex involves histone h2b and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol* 151, 1591-1598.
- Gomez E, Irvine DS and Aitken RJ (1998) Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationship with semen quality and sperm function. *Int J Androl* 21, 81-94.
- Haaf T and Ward DC (1995) Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by *in situ* hybridization and extended chromatin fibres. *Exp Cell Res* 219, 604-611.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ and Thompson W (1998) The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Human Reprod* 13, 1240-1247.
- Iwasaki A and Gagnon C (1992) Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 57, 409-416.
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H (2001) Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 55, 947-961.
- Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM and Jin F (1997) Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of non-smoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 89, 238-244.
- Jones R, Mann T and Sherins RJ (1978) Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proc R Soc Lond B* 201, 413-417.
- Knight JA and Marrett LD (1997) Parental occupational exposure and the risk of testicular cancer in Ontario. *J Occup Environ Med* 39, 333-338.
- Kobayashi H, Larson K, Sharma RK, Nelson DR, Evenson DP, Toma H, Thomas AJ and Agarwal A (2001) DNA damage in patients with untreated cancer as measured by sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 75, 469-475.
- Larson K, De Jonge C, Barnes A *et al.* (2000) Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15, 1717-1722.
- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET and Evenson DP (2003) Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 80, 895-902.
- Lewis SEM and Aitken RJ (2005) Sperm DNA damage, fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* (in press).
- López Teijón M, Garcia F, Serra O, Moragas M, Rabanal A, Olivares R, Alvarez JG (2007) Semen quality in a population of volunteers from the province of Barcelona. *Reprod Biomed Online* 15, 434-444.
- Maduro MR and Lamb DJ (2002) Understanding new genetics of male infertility. *J Urol* 168, 2197-2205.

- Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R and Spadafora C (1997) Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol* 16, 1087-1097.
- Manicardi G, Bianchi P and Pantano S (1995) Under protamination and nicking of DNA in ejaculated human spermatozoa are highly related phenomena. *Biol Reprod* 52, 864-867.
- Marcon L and Boissonneault G (2004) Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 70, 910-918.
- Martins RP, Ostermeier GC and Krawetz SA (2004) Nuclear matrix interactions at the human protamine domain: a working model of potentiation. *J Biol Chem* 279, 51862-51868.
- McKelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnston SR, Hughes CM, Lewis SE, Thompson W (1997) Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. *Mutat Res* 375, 93-104.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR and Zhao M (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483-488.
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G and Baldi E (2003) Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl* 24, 253-262.
- Oldereid NB, Rui H, Clausen OP, Purvis K (1989) Cigarette smoking and human quality assessed by laser-Doppler spectroscopy and DNA flow cytometry. *J Reprod Fertil* 86, 731-736.
- Olshan AF, Mattison DR, Zwanenburg TS (1994) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Cyclosporine A: review of genotoxicity and potential for adverse human reproductive and developmental effects. *Mutat Res* 317, 163-173.
- Ostling O and Johanson K (1984) Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages on individual cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 291-298.
- Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK (2005) Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 84, 356-364.
- Pienta KJ, Getzenberg RH and Coffey DS (1991) Cell structure and organization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1, 355-385.
- Pittoggi C, Zaccagnini G, Giordano R, Magnano AR, Baccetti B, Lorenzini R and Spadafora C (2000) Nucleosomal domains of mouse spermatozoa chromatin as potential sites for retroposition and foreign DNA integration. *Mol Reprod Dev* 56, 248-251.
- Richthoff J, Spano M, Giwercman YL, Frohm B, Jepson K, Malm J, Elzanaty S, Stridsberg M, Giwercman A (2002) The impact of testicular and accessory sex gland function on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Human Reprod* 17, 3162-3169.
- Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, Robbins WA, Perreault SD (2005) Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Human Reprod* 20, 2776-2783.
- Sakkas D, Manicardi GC and Bizzaro D (2003) Sperm nuclear DNA damage in the human. *Adv Exp Med Biol* 518, 73-84.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG and Bianchi U (1999) Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 4, 31-37.

- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N and Bizzaro D (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66, 1061-1067.
- Sergerie M, Ouhilal S, Bissonnette F, Brodeur J, Bleau G (2000) Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum Reprod* 15, 1314-1321.
- Seshagiri PB (2001) Molecular insights into the causes of male infertility. *J Biosci* 26, 429-435.
- Sgonc R and Gruber J (1998) Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol* 33, 525-533.
- Sharma RK and Agarwal A (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48(6), 835-850.
- Schmidt C, Heng HH, Rubin C, Ye CJ and Krawetz SA (2001) Sperm nuclear matrix association of the prm1→prm2→tnp2 domain is independent of alu methylation. *Mol Hum Reprod* 7, 903-911.
- Sikka SC, Rajasekaran M and Hellstrom WJG (1995) Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl* 16, 464-468.
- Singh NP, Muller CH and Berger RE (2003) Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 80, 1420-1430.
- Song GJ, Norkus EP, Lewis V (2006) Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *Int J Androl* 29, 569-575.
- Sotolongo B and Ward WS (2000) DNA loop domain organization: the three dimensional genomic code. *J Cell Biochem* 35, 23-26.
- Sotolongo B, Huang TF, Isenberger E and Ward WS (2005) An endogenous nuclease in hamster, mouse and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl* 26, 272-280.
- Sotolongo B, Lino E and Ward WS (2003) Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod* 69, 2029-2035.
- Spadafora C (1998) Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays* 20, 955-964.
- Spano M, Seli E, Bizzaro D, Manicardi GC, Sakkas D (2005) The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17(3), 255-260.
- Tateno H, Kimura Y and Yanagimachi R (2000) Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. *Biol Reprod* 63, 341-346.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP (2004) Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 81, 1289-1295.
- Ward WS (1993) Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 48, 1193-1201.
- Ward WS, Kishikawa H, Akutsu H, Yanagimachi H and Yanagimachi R (2000) Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis. *Zygote* 8, 51-56.
- Ward WS, Partin AW and Coffey DS (1989) DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 98, 153-159.
- Wolf H (1995) The biological significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 63, 1143-1157.
- World Health Organization (1999) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth Edition. Cambridge University Press.
- Wykes SM and Krawetz SA (2003a) Conservation of the prm1→prm2→tnp2 domain. *DNA Seq* 14, 359-367.

- Wykes SM and Krawetz SA (2003b) The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 278, 29471-29477.
- Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P and Bradbury EM (2002) Human testis/sperm-specific histone h2b (htsh2b). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* 277, 43474-43480.
- Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT (2001a) Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 75, 674-677.